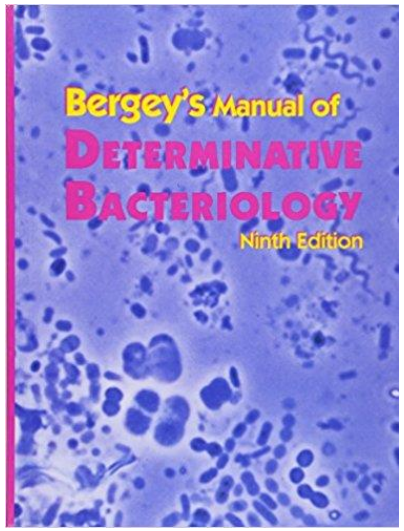
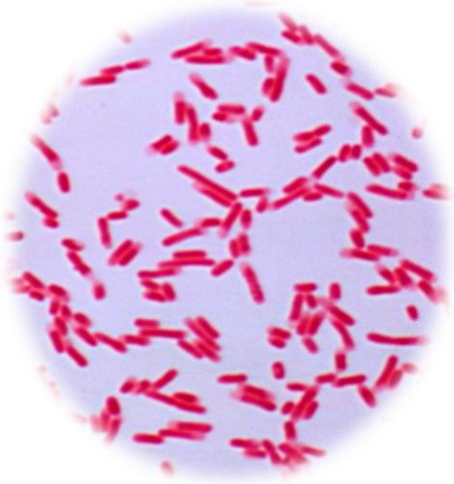
https://www.biomerieux.es/diagnostico-clinico/productos/gama-de-galerias-apir-id

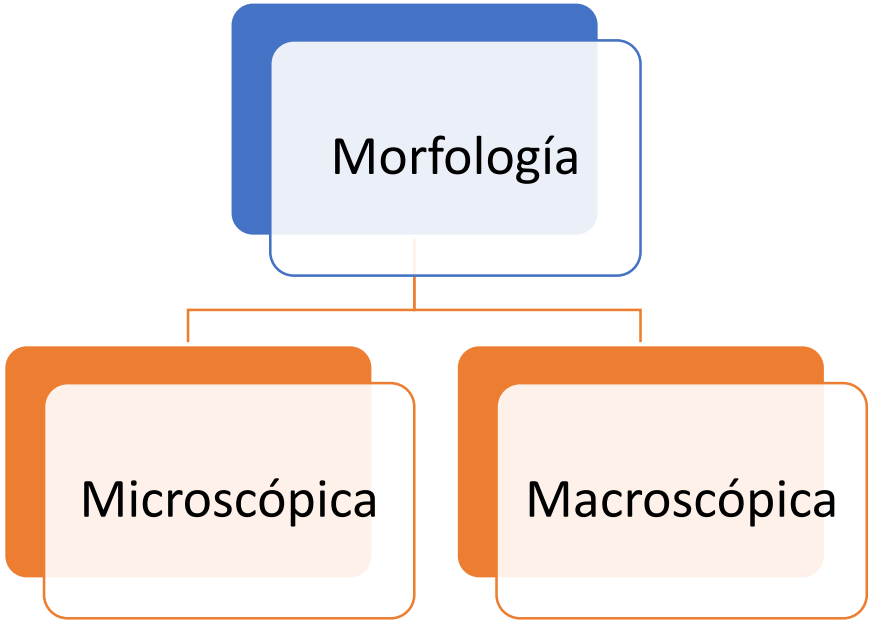
Práctica 5: Api 20E

© Olga Rivas Solano 2024

El sistema actual de taxonomía bacteriano está basado en características morfológicas y bioquímicas descritas en el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*





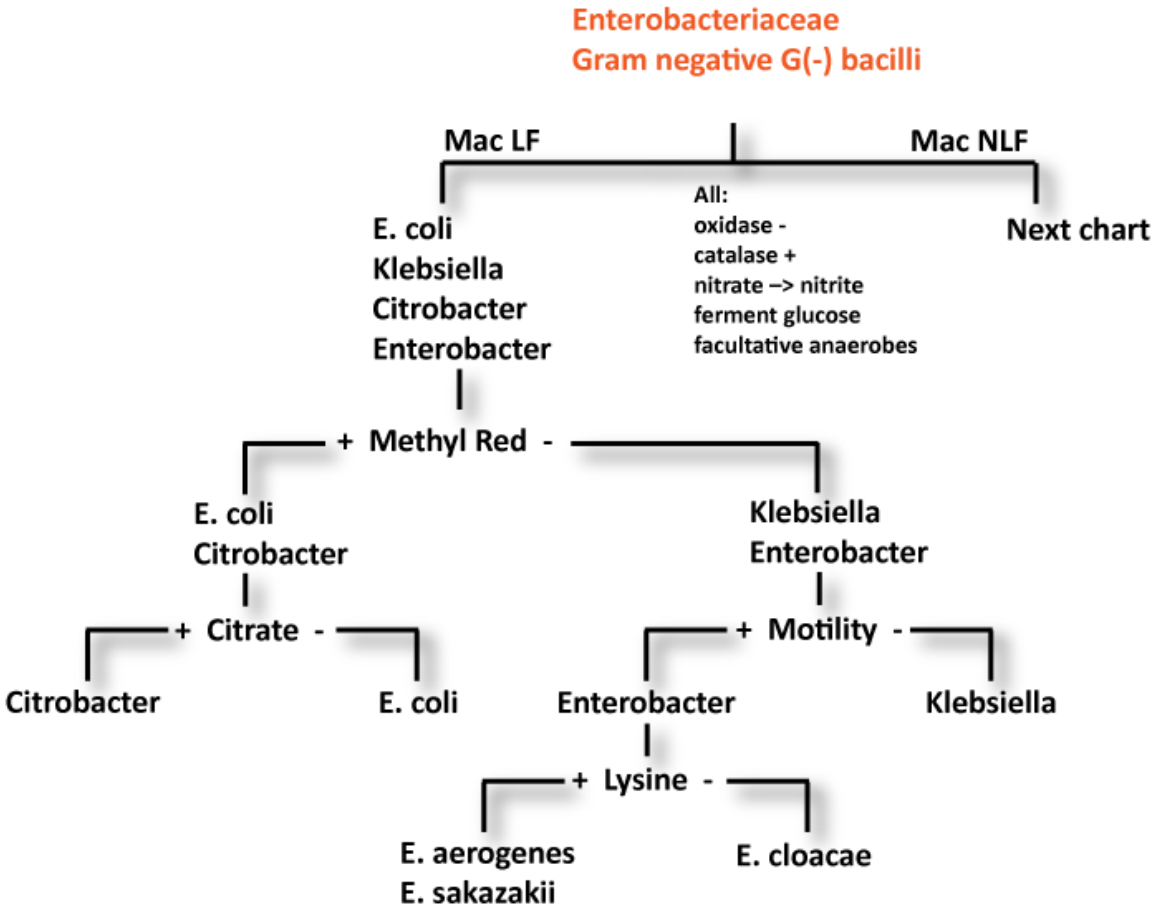


Sistemas miniaturizados de identificación bacteriana

- También se basan en características fisiológicas y bioquímicas
- Requieren conocer cierta información previa:
  - Básica:
    - Tinción de Gram (+ ó -)
    - Morfología (coco, bacilo, etc).
  - Otras características comunes:
    - Ej. El API 20E es para enterobacterias

Características comunes de las enterobacterias

Fenotípicas



Habitats/Importancia clínica

Enterobacteriaceae

Opportunistic pathogens

Escherichia coli

Klebsiella pneumoniae

Enterobacter aerogenes

Serratia marcescens

Proteus spp.

Providencia spp.

Citrobacter spp.

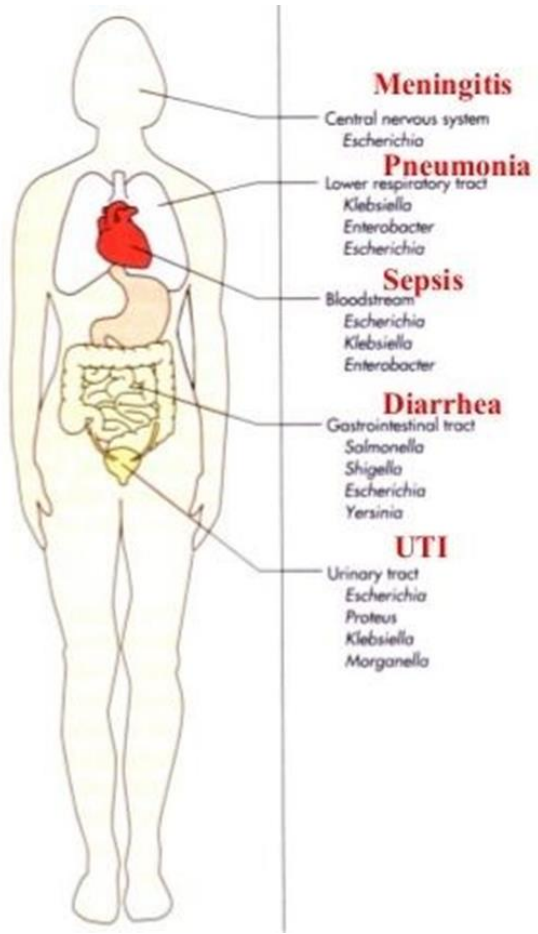
Obligate pathogens

Salmonella spp.

Shigella spp.

Yersinia spp.

Some *E. coli* strains

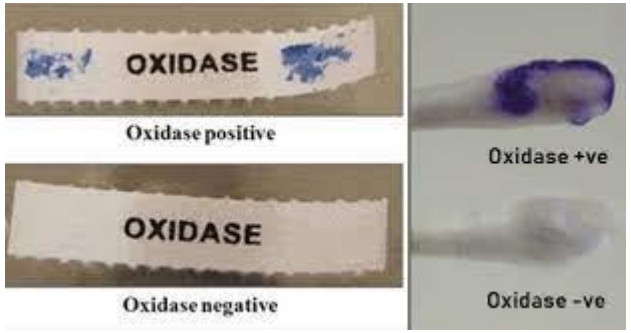


Enterobacterial Common Antigen: a carbohydrate antigen located in the outer membrane and in the periplasm

Galería Api 20E y prueba de oxidasa

La galería contiene 20 pruebas bioquímicas miniaturizadas, deshidratadas y estandarizadas para identificación de bacterias de la familia Enterobacteriaceae, principalmente de importancia clínica.

La prueba #21 es la oxidasa. Esta se monta por aparte. Existen tiras de papel impregnadas con el reactivo. En ellas se coloca el crecimiento bacteriano y se hace una lectura inmediata.



Prueba	Reacción / Enzimas	Resultado	
		Negativo	Positivo
ONPG	Beta-galactosidasa	sin color	amarillo
ADH	Arginina deshidrolasa	amarillo	rojo o naranja
LDC	Lisina descarboxilasa	amarillo	rojo o naranja
ODC	Ornitina descarboxilasa	amarillo	rojo o naranja
CIT	Utilización del citrato	verde	azul oscuro o turquesa
H2S	Producción de H_2S	sin precipitado negro	precipitado negro
URE	Ureasa	amarillo	rojo o naranja
TDA	Triptófano desaminasa	amarillo	marrón-rojo
IND	Producción de indol	amarillo	color rosa o anillo rosa-rojo
VP	Producción de acetoína (Voges-Proskauer)	sin color	rosa-rojo
GEL	Gelatinasa	sin difusión	difusión de pigmento
GLU	Fermentación/oxidación de glucosa	azul o verde	amarillo
MAN	Fermentación/oxidación de manitol	azul o verde	amarillo
INO	Fermentación/oxidación de inositol	azul o verde	amarillo
SOR	Fermentación/oxidación de sorbitol	azul o verde	amarillo
RHA	Fermentación/oxidación de ramnosa	azul o verde	amarillo
SAC	Fermentación/oxidación de sacarosa	azul o verde	amarillo
MEL	Fermentación/oxidación de melobiosa	azul o verde	amarillo
AMY	Fermentación/oxidación de amigdalina	azul o verde	amarillo
ARA	Fermentación/oxidación de arabinosa	azul o verde	amarillo
OX	Citocromo oxidasa	incoloro	morado

Metabolismo de aminoácidos

Como única fuente de C

A partir de compuestos azufrados

Pruebas que requieren la adición de reactivos especiales una vez transcurrido el tiempo de incubación

Metabolismo del triptófano

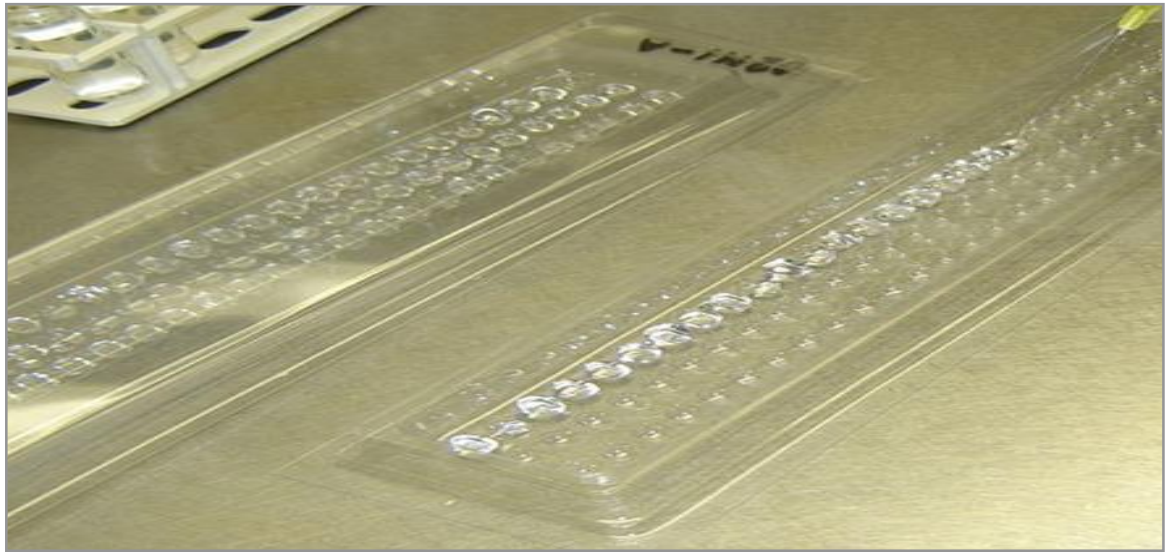
Se forma por la descarboxilación de dos moléculas de ácido pirúvico en la biosíntesis de butanodiol y acetilo

Por aparte y de lectura inmediata

Incógnitas

- A cada subgrupo se le asignará un cultivo incógnita.
- Todas las incógnitas son bacilos Gram negativos, oxidasa negativos que pertenecen a la familia Enterobacteriaceae.

Preparación de la suspensión bacteriana y de la galería



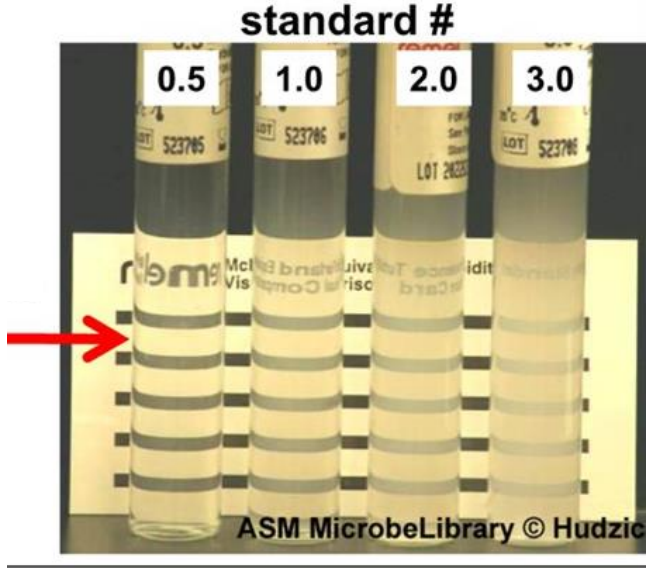
Llenar los pozos de la cámara húmeda con agua y colocar la tira dentro, inclinada sobre la tapa, para facilitar la inoculación

Preparar una suspensión bacteriana con turbidez visualmente similar a un estándar de MacFarland 0.5

Estándar de MacFarland 0,5

McFarland Standard	1% BaCl2(ml)	1% H2SO4 (ml)	Approximate Cell Count Density (x10^8 cells)
0.5	0.05	9.95	1.5 x 10^8
1.0	0.1	9.9	3.0 x 10^8
2.0	0.2	9.8	6.0 x 10^8
3.0	0.3	9.7	9.0 x 10^8

https://microbenotes.com/mcfarland-standards/

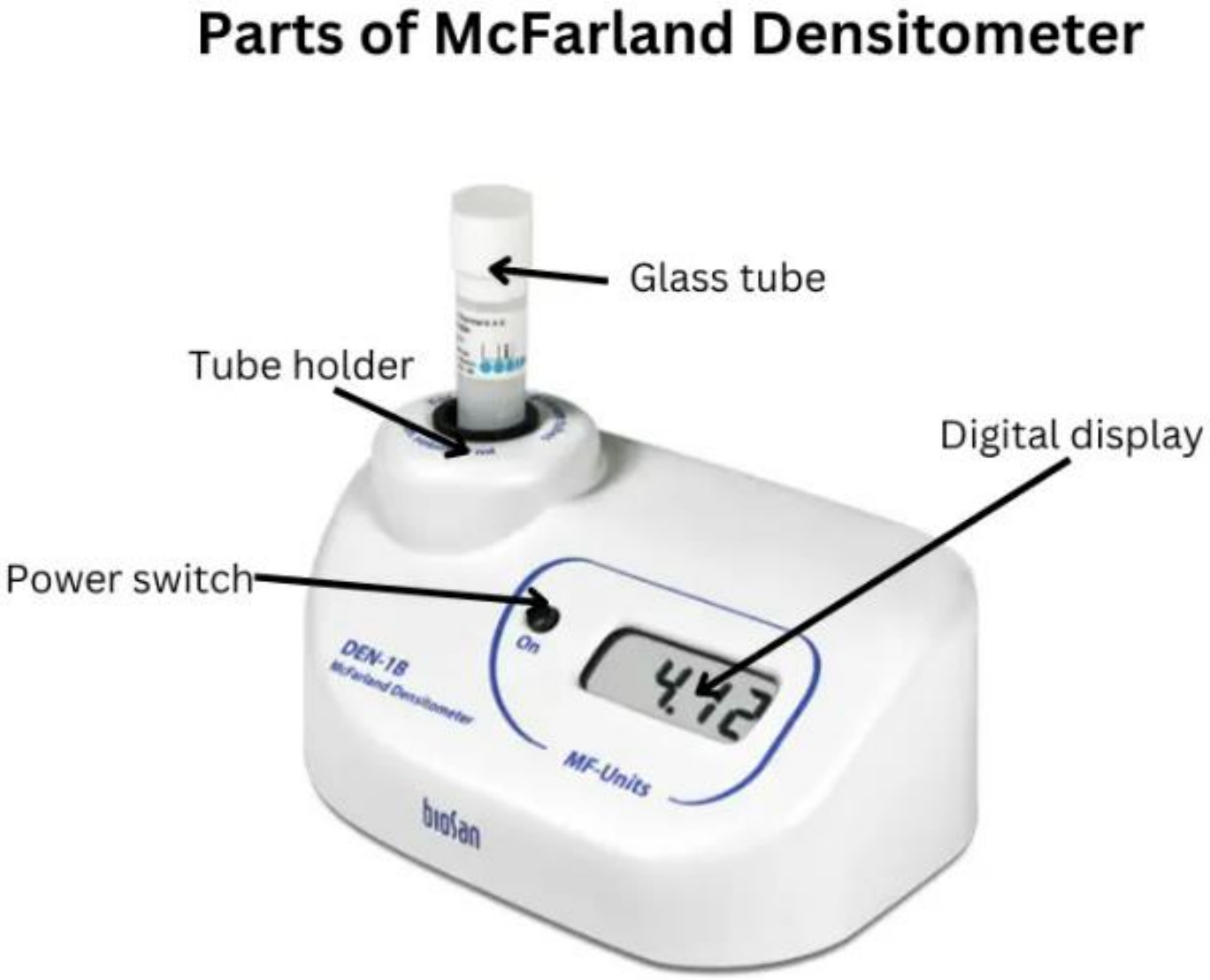


Comparación visual de la turbidez de los diferentes estándares usando una tarjeta Wickerham.

Al mezclar $BaCl_2$ con H_2SO_4, se forma un precipitado muy fino de cloruro de bario, lo que confiere turbidez a la solución y permite estandarizar inóculos bacterianos para diferentes aplicaciones. El estándar 0.5 tiene una turbidez equivalente a la turbidez de una suspensión bacteriana con una concentración de $1.5x10^8$ células/ml.

Bacterial suspension prepared to match the turbidity of the 0.5 McFarland turbidity standard

https://microbeonline.com/preparation-mcfarland-turbidity-standards/



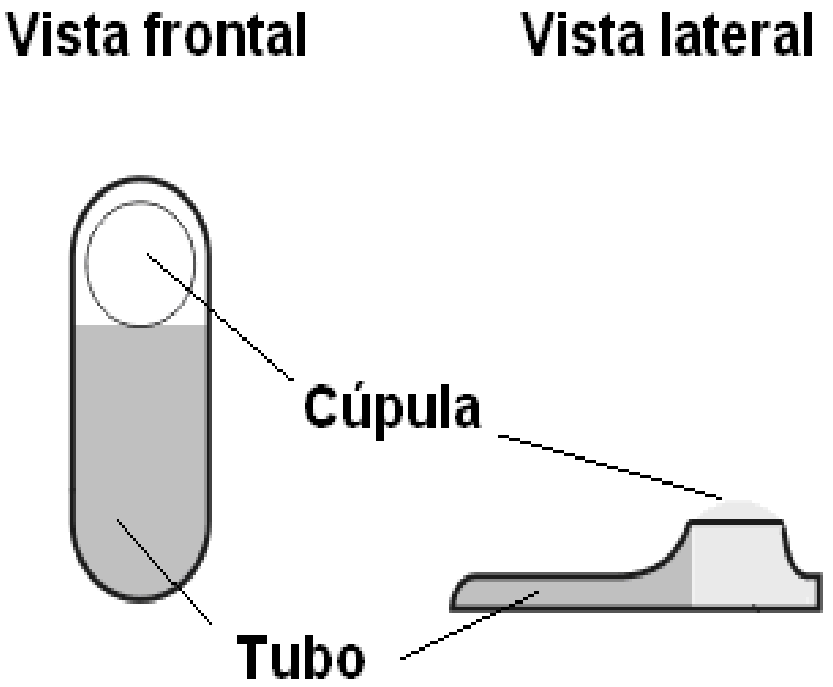
Parts of McFarland Densitometer

https://microbeonline.com/mcfarland-densitometer-parts-principle-and-operation/

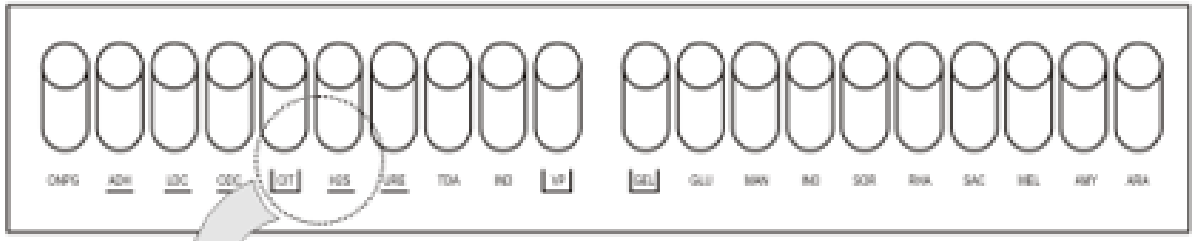
La comparación de turbidez entre la muestra y el estándar se puede hacer de forma más precisa con un densitómetro.

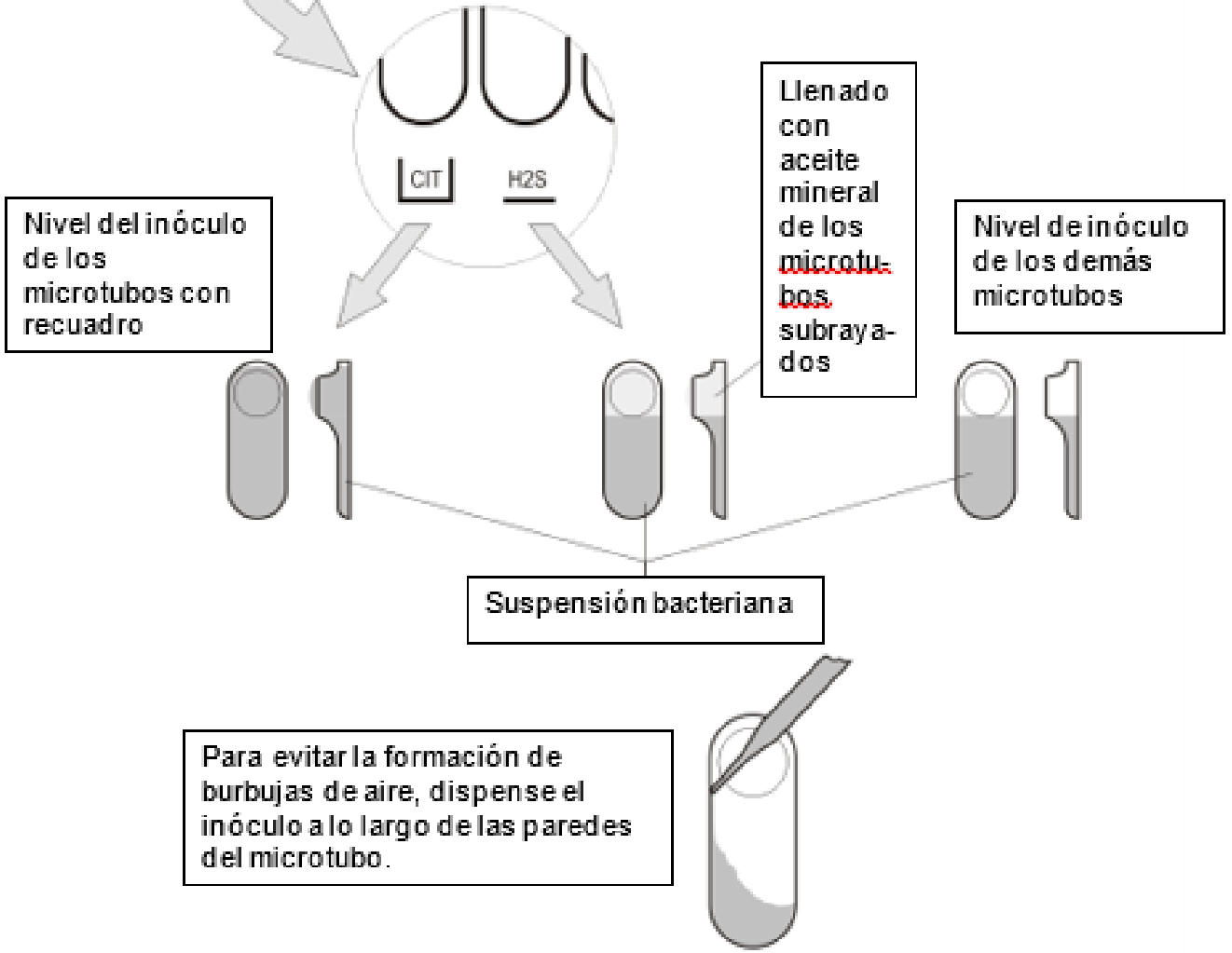
Inoculación

Colocar la tira dentro de la base y sobre la tapa para que quede en posición levemente inclinada para facilitar la inoculación



Los pozos pueden tener tres niveles de llenado


ONPG
ADH
LDC
ODC
CIT
H2S
URE
TDA
IND
VP
GEL
GLU
MAN
INO
SOR
RHA
SAC
MEL
AMY
ARA


CIT
H2S
Nivel del inóculo de los microtubos con recuadro
Llenado con aceite mineral de los microtubos subraya-dos
Nivel de inóculo de los demás microtubos
Suspensión bacteriana
Para evitar la formación de burbujas de aire, dispense el inóculo a lo largo de las paredes del microtubo.

Lectura e interpretación de resultados

- La galería se debe incubar 24 horas a 37 °C dentro de la cámara húmeda.
- Transcurrido ese tiempo se debe revisar el tubo de la glucosa.
- Esta prueba siempre debe ser positiva.
- Si está negativa se debe reincubar 24 horas más.
- Si está positiva, se puede proceder con la lectura directa e indirecta de los resultados.

Pruebas de lectura directa e indirecta (necesitan adición de reactivos)

Identificación de pruebas positivas y negativas por el color

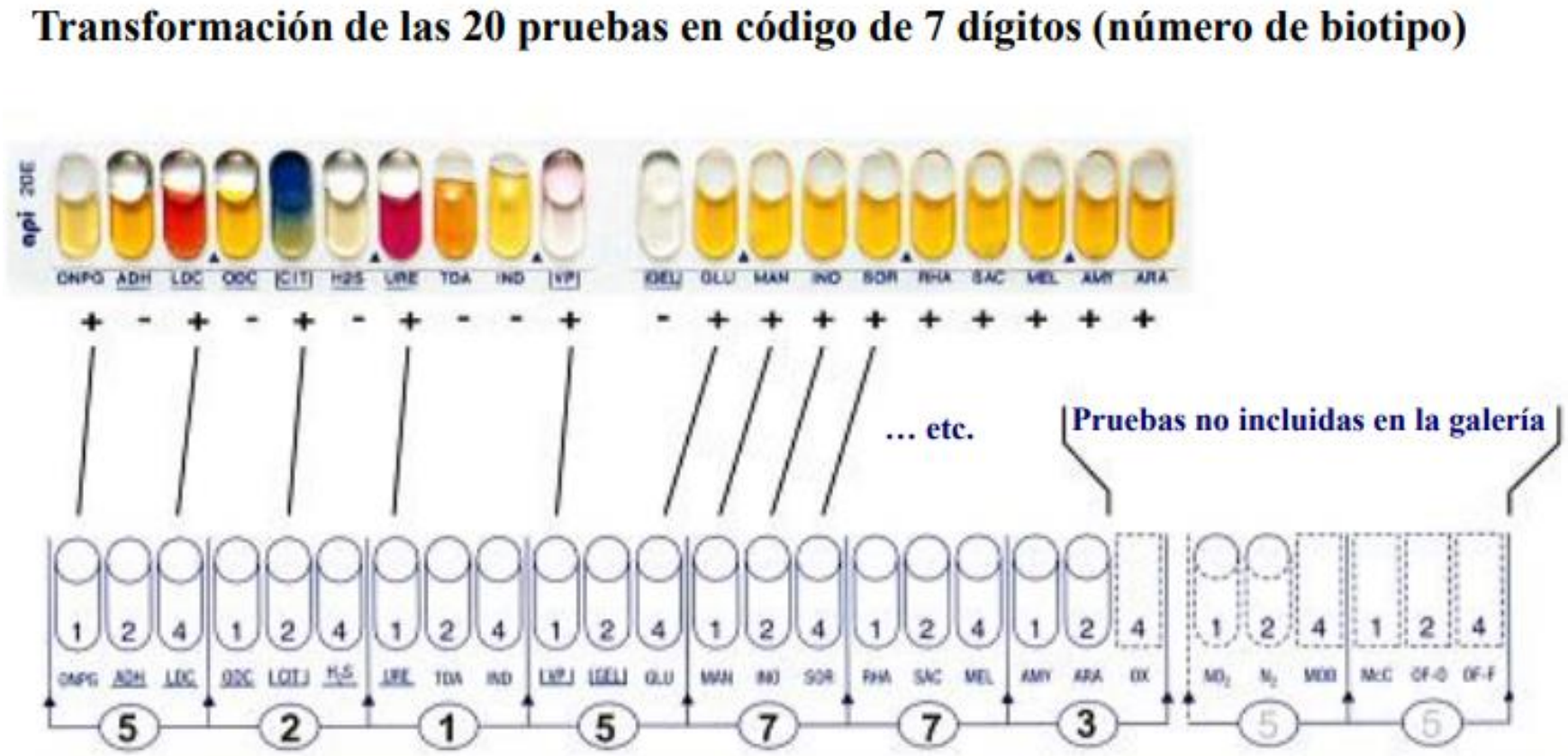
API 20E

Pruebas negativas

Pruebas positivas

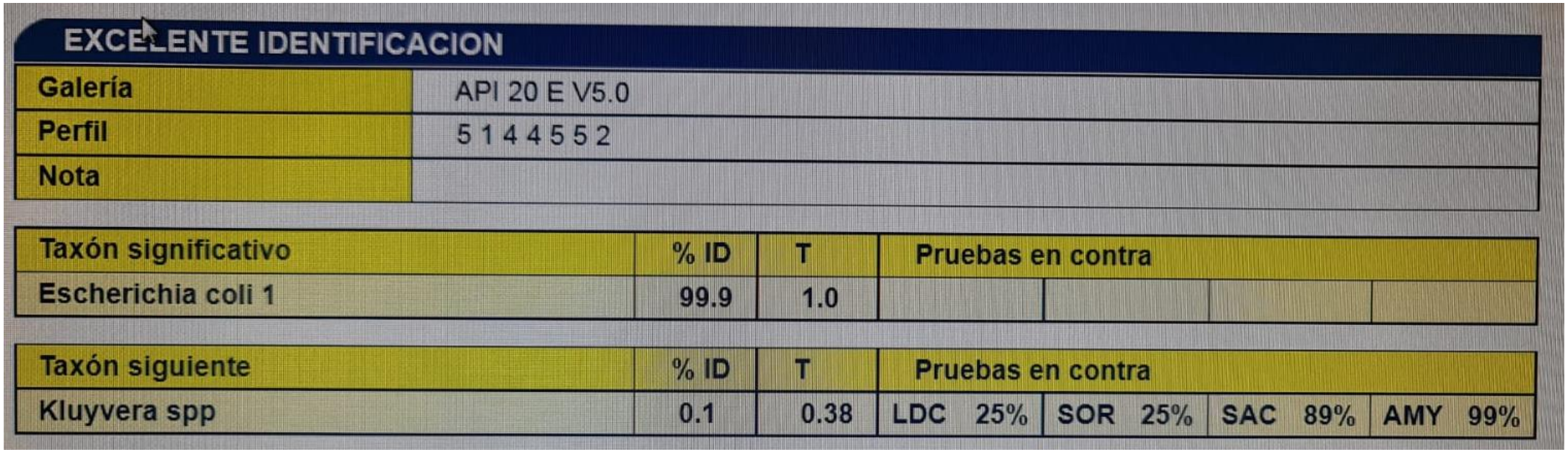
Obtención del código de identificación de la incógnita

- Los resultados se anotan en la hoja de lectura.
- Cada prueba tiene un valor que puede ser 1, 2 ó 4, según lo indicado en la hoja.
- Si la prueba es positiva, se suma su valor, **por tripletas de pruebas**, para obtener un código de identificación de siete dígitos.



Identificación

- Una vez obtenido el código de identificación, deben enviarlo por correo a su profesor(a), junto con el #de incóginita, para verificar si la identificación fue correcta.
- Para ello, los códigos se introducen en un sistema informático que los traduce en un resultado de identificación.
- La identificación puede tener varios niveles, desde excelente hasta sin identificar.
- El sistema señala las pruebas en contra y sugiere pruebas complementarias no incluidas en la tira para intentar lograr la identificación en caso necesario.



EXCELENTE IDENTIFICACION

Galería	API 20 E V5.0
Perfil	5 1 4 4 5 5 2
Nota	

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
Escherichia coli 1	99.9	1.0				

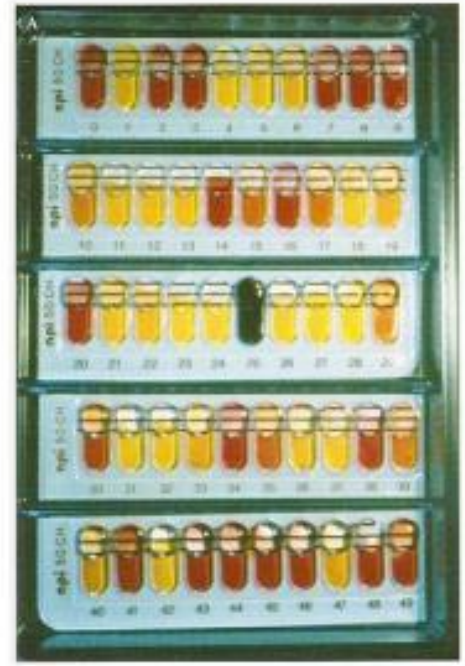
Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra			
Kluyvera spp	0.1	0.38	LDC 25%	SOR 25%	SAC 89%	AMY 99%

Ejemplos de otros tipos de galerías Api para identificación de otros grupos bacterianos

API 20 NE (No fermentadores)

API 20 A (Anaerobios)

API 50 CH



API CORYNE

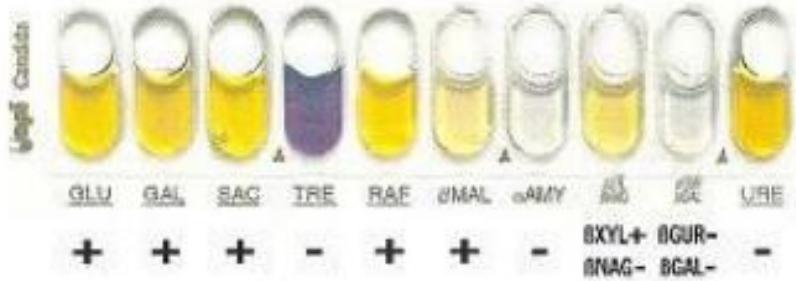
Corynebacterium renale ATCC 19412

API LISTERIA

Listeria monocytogenes ATCC 19115-4B

API CANDIDA

Candida guilliermondii ATCC 6260



API NH

Neisseria gonorrhoeae ATCC 31426